Cryptogamie, Mycol. 1987, 8 (3) : 209-217

CONTROLE MORPHOGÉNÉTIQUE DE LA DIFFÉRENCIATION DES SCLÉROTES DE *SCLEROTINIA FRUCTIGENA* : I - ÉTUDES PHYSIOLOGIQUES

par L. NAJIM*

RÉSUMÉ. — Deux milieux de culture, le MCA (malt, casamino-acides) et le milieu synthétique dit de Vogel, qui permettent une croissance végétative presque similaire, ont été utilisés pour induire la morphogenèse des sclérotes de *Sclerotinia fructigena* (Ader. et Ruhl.) dans des conditions de croissance normale ou à la suite de variations de facteurs physiques tels que la lumière et la température. Le milieu MCA est plus favorable pour la différenciation des sclérotes que le milieu synthétique de Vogel.
Par ailleurs, un régime photopériodique de 12 h de lumière et de 12 h d'obscurité par jour affecte peu la différenciation des sclérotes : cependant, une lumière continue exerce une forte action inhibitrice sur leur morphogenèse. Par contre, l'obscurité totale augmente d'une manière sensible le poids de sclérotes par boîte de Pétri. De plus, le transfert des cultures d'une température à une autre («shift-down») a permis de contrôler l'induction, la différenciation et la maturation des sclérotes.

SUMMARY. — Two culture media, the MCA (Malt, casamino-acids) and the so called Vogel synthetic one which allowed a similar vegetative growth, were used to induce sclerotia in *Sclerotinia fructigena* (Ader. and Ruhl.) in normal conditions of growth, or after variations of physical factors such as light and temperature. The MCA medium, is however more favorable than the synthetic one for sclerotia production.
A photoperiodical regime of 12 h of light and 12 h of darkness each day does not affect much sclerotia differentiation : on the other hand, continuous light has a strong inhibitory effect on sclerotia morphogenesis. By opposition, darkness leads to a sensible increase in the sclerotia weight per Petri dish. Furthermore, the transfer of culture from one temperature to another with a «shift-down» allowed us to control induction, differentiation and maturation of sclerotia.

MOTS CLÉS : *Sclerotinia fructigena*, sclérotes, physiologie, différenciation, milieux de culture, facteurs physiques.

INTRODUCTION

Le *Sclerotinia fructigena* est un champignon pathogène agent de la moniliose pour un certain nombre de plantes de la famille des Rosacées à pépins et à

* Laboratoire de Cryptogamie, Faculté des Sciences de Rabat, Avenue Ibn Batota, B.P. 1014, Rabat, Maroc.

noyaux. Ce champignon différencie trois types de fructifications : les macroconidies, les microconidies et les sclérotes.

Les sclérotes sont les organes de développement qui assurent la pérennité de cette espèce. Dans la nature, les sclérotes se forment sous l'épiderme des fruits parasités en voie de «momification».

En culture sur milieu gélosé, les sclérotes sont tubéroïdes ou sphériques et de taille variable; ils se développent soit en surface soit dans le substratum.

Les études concernant l'influence du milieu nutritif et des facteurs physiques sur la différenciation des sclérotes sont peu nombreuses (TREVETHICK & COOKE, 1971; WANG & LE TOURNEAU, 1972; OKON & al., 1972; MOORE & JIRJIS, 1976; ZOBERI, 1980), et particulièrement celles se rapportant au *Sclerotinia fructigena* (BYRDE & WILLETTS, 1977). Cependant, ces facteurs ont été étudiés soit séparément soit de manière combinée afin de déterminer la physiologie et le potentiel de production des sclérotes de cette espèce.

Cette étude porte sur le contrôle de la morphogenèse des sclérotes en utilisant les facteurs trophiques et physiques les plus importants, tels que la lumière et la température.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souche et méthodes culturales

La souche de *Sclerotina fructigena* (Ader. & Ruhl.) (ou *Monilinia fructigena* selon Honey) a été isolée d'une pomme momifiée. Cette souche a été maintenue en culture sur du malt gélosé à 2 %. Deux milieux de culture ont été utilisés pour l'expérimentation : un milieu «naturel» enrichi (semi-synthétique) et un milieu synthétique. Le milieu semi-synthétique est composé d'un extrait de malt à 2 % avec de la gélose à 2 % et 0,25 % d'un hydrolysat de caséine exempt de vitamines (MCA) (NAJIM & TURIAN, 1979). Le milieu de culture synthétique est le milieu de VOGEL (1964), qui est à base de sels d'ammonium (V).

Pour les études relatives à la seule croissance végétative, les cultures ont été incubées à 23°C et maintenues à l'obscurité totale pendant les 7 jours suivant l'inoculation, pour assurer un recouvrement mycélien maximum des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre (condition standard).

Les effets des facteurs physiques les plus importants : lumière et température, sur la biogenèse et la différenciation des sclérotes, ont été étudiés simultanément aux facteurs trophiques.

Action de la lumière

Différents régimes d'éclairement ont été expérimentés : lumière artificielle continue (800 Lux), lumière naturelle, obscurité totale et une exposition à un rythme périodique de 12 heures de lumière (800 Lux) et 12 heures d'obscurité par jour (= 12 h, 12 h) pendant un maximum de 35 jours.

Action de la température

Les cultures végétatives après 7 jours de croissance, sont transférées de 23°C à de plus basses températures : 20, 15, 10, 5 et 3°C («shift-down») pour une durée allant de 2 à 35 jours, selon le degré de maturation des sclérotes recherché.

Expression des résultats

L'influence de la température a été jugée en prenant comme référence le poids frais des sclérotes obtenu entre 0 et 25°C sous régime photopériodique (12 h, 12 h).

Du fait de la taille variable des sclérotes de *Sclerotinia fructigena*, le critère de comparaison retenu a été le poids frais par boîte de Pétri et non pas le nombre de sclérotes (voir Figs. 2, 3). Ce poids frais des sclérotes isolés de la gélose, a été apprécié pour les différentes expérimentations afin de mener une étude comparative sur la différenciation des sclérotes.

RÉSULTATS

Influence du milieu nutritif

Une étude préalable effectuée sur la croissance mycélienne montre que les cinétiques de la croissance à 23°C, avec 12 heures d'exposition à la lumière et

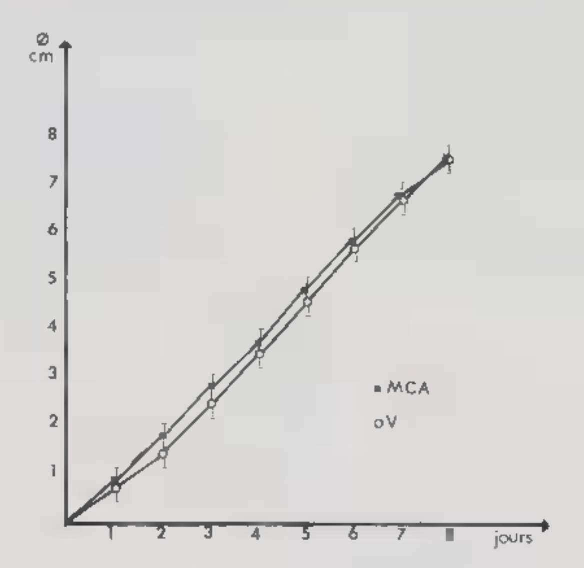


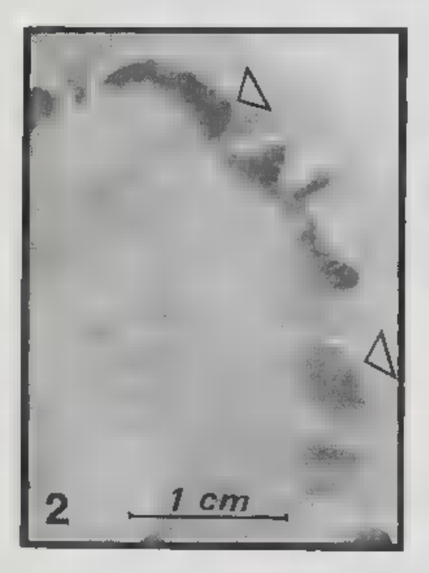
Fig. 1. — Cinétiques de la croissance végétative sur le milieu semi-synthétique (MCA) et sur le milieu de Vogel (V) sous un régime photopériodique de 12h, 12h/jour dès la mise en culture.

Fig. 1. — Kinetics of vegetative growth on semi-synthetic medium (MCA) and on Vogel medium under a photoperiod of 12h, 12h per day.

12 heures d'obscurité par jour, sont tout à fait comparables pour les deux milieux de croissance utilisés et que le recouvrement mycélien des boîtes de Pétri est atteint au bout de 7 jours de croissance (Fig. 1).

Les cultures maintenues pendant 7 jours à l'obscurité totale et à 23°C présentent le même recouvrement mycélien que celles exposées à la lumière. Les sclérotes ne commencent à se différencier qu'après le recouvrement total des boîtes de Pétri par le mycélium, ils se présentent sous la forme de masses tubéroïdes de 1 à 4 cm de longueur dans les conditions normales de croissance.

En général, les sclérotes se forment à la surface des boîtes de Pétri et restent couverts par du mycélium aérien qui forme un feutrage tout autour (Fig. 2). Certains sclérotes peuvent se différencier dans le substratum et présenter un cortex réduit. Sur les boîtes de Pétri exposées auparavant au régime photopé-



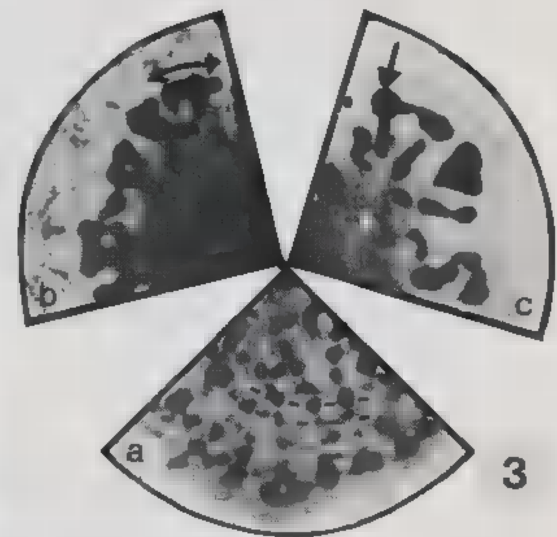


Fig.2 – Culture de *Sclerotinia fructigena* sur MCA (obscurité totale à 10°C). Sclérotes tubéroïdes (△) reliés entre eux, formant une masse. Sclérotes recouverts par un duvet mycélien blanchâtre.

Fig. 2 – *Sclerotinia fructigena* culture on MCA (whole darkness at 10°C). Tubercular sclerotia (△) related together and forming one mass. Sclerotia covered by a downy and white mycelia.

Fig. 3 – a) Revers de culture de *S. fructigena* exposée à un régime photopériodique de 12 h, 12 h à 10°C. Sclérotes nombreux, petits et répartis en cercles concentriques (- - - -). b) et c) Revers de cultures maintenues à 10°C à l'obscurité totale. Sclérotes tubéroïdes, s'étalant sur toute la boîte de Pétri (flèches).

Fig. 3 – a) Reverse side of *S. fructigena* culture exposed under a photoperiod of 12 h, 12 h per day at 10°C. Numerous and small sclerotia distributed in cencentric circles (- - -). b) and c) Reverse side of culture maintained at 10°C in whole darkness. Tubercular sclerotia, covering all the Petri dish (Arrows).

riodique (12 h, 12 h) les sclérotes se forment en zones concentriques qui coïncident avec les coussinets conidifères caractéristiques du genre *Monilia* (Fig. 3a).

Le poids des sclérotes récoltés sur le milieu MCA est environ le double de celui obtenu sur le milieu V, bien que le recouvrement en mycélium des boîtes de Pétri soit à peu près identique dans tous les cas étudiés et pendant toute la durée des différentes expérimentations (Fig. 4).

Influence de la lumière

Sur les deux milieux de culture, le poids des sclérotes obtenu avec un éclairement naturel est comparable à celui récolté à l'issue d'un régime photopériodique (12 h, 12 h) par jour (Fig. 4).

Le phénomène de zonation des coussinets conidifères provoqués par les variations cycliques de la lumière (JEREBZOFF, 1965) se retrouve également pour les sclérotes. Ces derniers ont tendance à se confondre avec les coussinets conidifères en cercles concentriques (Fig. 3a).

Si les cultures sont maintenues à l'obscurité totale, des agrégats de mycélium apparaissent à partir de 7 jours de culture sous la forme de trois ou quatre masses mycéliennes qui commencent à se mélaniser dès les premiers stades de

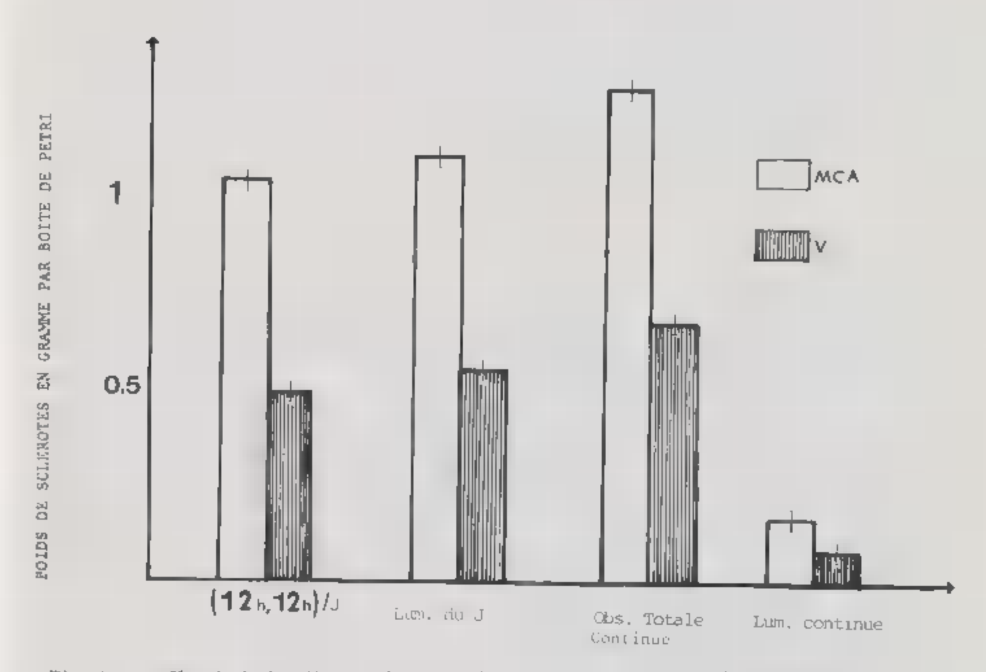


Fig. 4. — Effet de la lumière sur la biogenèse des sclérotes, exprimé en grammes de poids frais de sclérotes récoltés sur le milieu MCA et sur le milieu de Vogel (V).

Fig. 4. — Effect of light on sclerotia biogenesis, expressed in fresh weight (g) of sclerotia obtained on MCA and V media.

formation. Sur ces cultures, les sclérotes se différencient soit en surface soit dans le substratum. Par contre, ces sclérotes ont tendance à devenir plus volumineux et moins nombreux et tubéroïdes à leurs extrémités (Fig. 3a, b, c).

Toutefois, les cultures exposées à la lumière continue pendant 21 jours différencient très peu de sclérotes, que ce soit sur milieu «naturel» ou sur milieu synthétique.

La figure 4 montre que la lumière dans son ensemble affecte partiellement la différenciation des sclérotes. En effet, les différents types d'éclairements périodiques jouent un rôle limité dans la différenciation des sclérotes. Il n'en va pas de même pour la lumière continue qui exerce une forte inhibition sur la morphogenèse des sclérotes.

Influence de la température

La morphogenèse des sclérotes de *S. fructigena* est aussi déterminée par la température. L'effet de la température a été étudié principalement sur le milieu MCA. Les cultures qui sont directement incubées après l'inoculation à telle ou telle température, présentent une différenciation en sclérotes plus ou moins étalée dans le temps et étroitement dépendante du recouvrement des boîtes de Pétri en mycélium.

Les sclérotes atteignent leur maturation au bout de 21 jours d'incubation à 23°C, cependant quelques masses sclérotiales peuvent encore se former jusqu'à 35 jours mais elles restent toutefois immatures.

Par contre, avec le système de transfert d'une température à une autre (ou «shift-down»), la différenciation des sclérotes est amplifiée (Tab. 1). En effet, les transferts des cultures végétatives, de 23°C à 15 ou 10°C, stimulent et

Tableau 1. – Expérience de «Shift-down» sur milieu MCA : les cultures sont transférées pour des durées variables sous diverses conditions lumineuses et thermiques. Les résultats sont exprimée en grammes de poids frais de sclérotes par boîte de Pétri (moyenne sur 60 boîtes de Pétri).

Table 1. – Experience of Shift-down on MCA medium : cultures are transfered under diverse conditions of light and temperature for different times. Results are expressed in fresh weight (g) of sclerotia per Petri dish (average on 60 Petri dishes).

Température		23°C		25°C/15°C		23°C/10°C	
Éclairement		12h/12h	Obscurité	12h/12h	Obscurité	12h/12h	Obscurité
Délais d'observation	21j	0.50 (± 0.02)	0.55 (± 0.03)	1.05 (± 0.03)	1.15 (± 0.05)	0.60 (± 0.02)	0.80 (± 0.03)
(après transfert des cultures	26j	0.57 (± 0.04)	0.63 (± 0.03)	1.20 (± 0.02)	1.25 (± 0.03)	0.73 (± 0.03)	0.95 (± 0.04)
végétatives)	35j	0.65 (± 0.03)	0.73 (± 0.05)	1.29 (± 0.04)	1.35 (± 0.05)	0.95 (± 0.04)	1.10 (± 0.05)

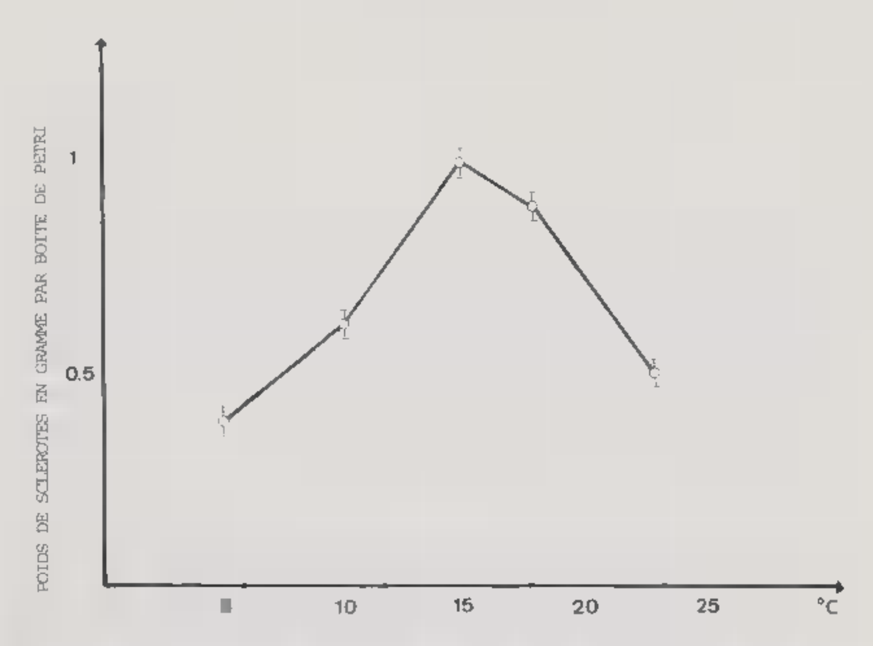


Fig. 5. — Effet de la température sur la biogenèse des sclérotes. Cultures sur le milieu MCA, après 21 jours de «shift-down» de température sous un régime photopériodique de 12h, 12h.

Fig. 5. — Effect of temperature on sclerotia biogenesis. Culture on MCA medium, after 21 days of shift down of temperature under a photoperiod rythm of 12 h, 12 h.

synchronisent la biogenèse des sclérotes. Il apparaît sur la figure 5 qu'un transfert à 15°C est très favorable pour la production des sclérotes; en effet on totalise un poids frais moyen de 1,05 g par boîte de Pétri dès 21 jours de culture avec un régime photopériodique de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité. Le poids est de 1,15 g à l'obscurité totale.

Influence de la lumière et de la température

Une interaction convenable des facteurs «température» et «lumière» peut être favorable à une forte production des sclérotes.

Les cultures exposées à la lumière et incubées à de basses températures forment de nombreux sclérotes (Fig. 3a). Par contre, si ces cultures sont maintenues à l'obscurité, la production des sclérotes est différente : ils sont moins nombreux mais plus volumineux (Fig. 3b, c). Si l'effet de la chute de température est combiné à celui de l'obscurité, le développement des sclérotes est amplifié comparé aux cultures maintenues à la température initiale mais exposées à la lumière (Fig. 3).

Les deux facteurs «lumière» et «température» permettent en effet un contrôle de la différenciation et de la production des sclérotes à partir des hyphes végé-

tatives, et facilitent par ailleurs toutes les études en microscopie optique et électronique sur la morphogenèse et la différenciation cellulaire des sclérotes.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

On ■ montré que la biogenèse des sclérotes est contrôlée par les facteurs trophiques et physiques (Figs. 2, 3). Par ailleurs, l'influence des facteurs physiques a été mise en évidence sur le milieu MCA (NAJIM & TURIAN, 1979).

La composition du milieu nutritif joue un rôle important dans la différenciation des sclérotes où elle peut influer sur le taux de production de ces derniers (TREVETHICK & COOKE, 1971; WANG & LE TOURNEAU, 1972; OKON & al., 1972; MOORE & JIRJIS, 1976; ZOBERI, 1980). En effet, les milieux de culture défavorisant la croissance végétative engendrent très peu de sclérotes et les milieux assurant une croissance végétative appréciable ne sont pas tous favorables à une différenciation des sclérotes. Les deux milieux de culture choisis pour notre expérimentation permettent une croissance végétative rapide (Fig. 1). Le milieu de culture MCA semble en outre favorable à une différenciation régulière des sclérotes. Dans les conditions normales de croissance, c'est-à-dire à 23°C sous un régime photopériodique de 12 h de lumière et de 12 h d'obscurité par jour, les sclérotes arrivent à maturité au bout de 35 jours environ et ceci correspond probablement à l'épuisement du milieu en substances nutritives. Ainsi, l'appauvrissement progressif du milieu de culture pourrait induire simultanément le développement des sclérotes, à condition qu'il n'y ait pas d'inhibiteurs dans le limieu.

La température est un élément capital dans la différenciation fongique, car elle peut accélérer ou ralentir certains phénomènes biologiques. Chez le *S. fructigena*, la méthode de transfert de cultures («shift down») à des températures plus basses, a permis d'établir les limites de différenciation des sclérotes en fonction de la température. Les sclérotes se différencient pour toutes les températures testées de 23°C à 5°C, mais avec un maximum à 15°C (Fig. 5). Par ailleurs aucune relation n'a pu être mise en évidence en ce qui concerne le nombre et le poids frais des sclérotes; toutefois, plus la température diminue et plus les sclérotes deviennent volumineux, tubéroïdes mais moins il sont nombreux.

A une température donnée, on observe une augmentation linéaire du poids des sclérotes durant toute la période de développement, jusqu'à la maturation (Tab. 1). Dans les conditions standard de croissance, les sclérotes ont tendance à se former à l'emplacement des coussinets conidifères, ce qui n'est pas le cas quand les cultures sont maintenues à l'obscurité, ce qui montre, en effet, une certaine sensibilité à la lumière. Cependant, une exposition continue à la lumière exerce une action fortement inhibitrice sur la formation des sclérotes (Fig. 4). Par opposition, l'obscurité totale favorise le développement des sclérotes quelle que soit la température d'incubation et fait disparaître le phénomène de zonation des sclérotes (Figs. 3b, c).

En combinant le facteur température («shift-down») et le facteur lumière,

on observe une progression plus ou moins linéaire du poids frais de sclérotes durant la croissance et le développement des cultures (Tab. 1). L'effet de la lumière, cumulé avec une basse température ralentit le développement des sclérotes qui deviennent massifs. Par contre, à l'obscurité la production des sclérotes est de nature différente : ils sont plus volumineux et forment plusieurs masses tubéroïdes.

En conclusion, le développement accéléré et contrôlé des sclérotes au laboratoire par la méthode des chutes de température constitue un matériel de choix pour l'étude de la genèse et de la différenciation des sclérotes. Par ailleurs, l'influence qualitative et quantitative de la lumière sur la différenciation des sclérotes pourrait être abordée en complément à l'action de la température.

REFERENCES

BYRDE R.J.W. and WILLETTS H.J., 1977 – The brown rot Fungi of fruit. Their biology and control. London, Pergamon Press.

JEREBZOFF S., 1965 – Growth rythms. *In* : G.C. AINSWORTH & A.S. SUSSMAN, *The Fungi*. N. Y. & London, Academic Press, Vol. I : 625-645.

MOORE D. and JIRJIS R.J., 1976 – Regulation of sclerotium production by primary metabolites in *Coprinus cinereus (C. Lagopus* sensu Lewis). *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 66 : 377-382.

NAJIM L. and TURIAN G., 1979 – Ultrastructure de l'hyphe végétative. *Sclerotinia fructigena* (Ader. et Ruhl.). *Canad. J. Bot.* 57 : 1299-1313.

OKON Y., CHET I. and HENIS Y., 1972 – Lactose induced synchronous formation in *Sclerotium rolfsii* and its inhibition by ethanol. *J. Gen. Microbiol.* 71 : 465-470.

TREVETHICK J. and COOKE R.C, 1971 – Effects of some metabolic inhibitors and sulphur-containing amino acids on sclerotium formation in *Sclerotium rolfsii, S. delphinii* and *Sclerotinia slcerotiorum. Trans. Brit. Mycol. Soc.* 57 : 340-342.

VOGEL H.J., 1964 – Distribution of lysine patways among Fungi, evolutionary implications. *Amer. Nat.* 98 : 124-137.

WANG S.W. and LE TOURNEAU D., 1972 – Amino acids as nitrogen sources for growth and sclerotium formation in *Sclerotinia sclerotiorum. Trans. Brit. Mycol. Soc.* 59 : 509-512.

ZOBERI M.H., 1980 – Some nutritional factors regulating formation of sclerotia in *Sclerotium rolfsii. Canad. J. Bot.* 58 : 2448-2490.